

**ANALISIS GENETIK MOLEKUL DAN IMUNOFENOTIP PENYAKIT NON-
HODGKIN'S LYMPHOMA DI KELANTAN**

Oleh

KHAIRANI IDAH MOKHTAR

Tesis yang diserahkan untuk memenuhi
keperluan bagi Ijazah Sarjana Sains

Disember 2001

Dedikasi

Ditujukan khas buat suami, Mohamed Saufi dan anakanda Maisarah. Juga buat ayahanda dan bonda yang amat dikasihi dan dihormati; Tuan Hj Mokhtar Hassan dan Hjh Wan Hasnah Wan Ismail.

Terima kasih di atas segala sokongan dan galakan yang berpanjangan.

PENGHARGAAN

Syukur Alhamdulillah diucapkan ke hadrat ALLAH S.W.T. kerana dengan izinNYA tesis ini dapat disiapkan dalam jangkamasa yang ditetapkan.

Ribuan terima kasih dan penghargaan yang tak terhingga buat penyelia-penyelia saya iaitu Prof. (Dr). Abdul Aziz Baba dan Prof. Madya (Dr). Mohd Nizam Isa di atas segala tunjuk ajar, nasihat, cadangan serta masa yang telah diberikan dalam memastikan kajian dan tesis ini dapat disiapkan dengan sempurna. Segala ilmu pengetahuan yang telah diperolehi sepanjang menjalankan kajian dan menyiapkan tesis ini akan saya manfaatkan dengan sebaik mungkin. Penghargaan juga kepada geran jangka panjang IRPA-RM7 (390/9606/1012) dan geran jangka pendek-USM (391/9619/1019) sebagai sumber kewangan dalam memastikan pelancaran perjalanan projek ini. Anugerah biasiswa RLKA oleh pihak USM adalah amat dihargai.

Saya juga menghargai pegawai sains dan juruteknologis makmal perubatan yang telah banyak membantu dan memberi nasihat secara langsung atau tidak langsung dalam memastikan kajian ini dilakukan dengan sempurna termasuk En. Kholid Ali dan Pn. Rashidah Mohd. Yatim serta En. Rosli Jusoh dan En. Ismail Manan (Jab. Patologi), Pn. Azma Hayati Abdullah dan En. Jamarudin Mat Asan (Jab. Immunologi), En. Mohd. Ros Sidek, Pn. Siti Fatimah Ramli dan Pn. Nor Atifah Adam (Pusat Genom Manusia). Penghargaan juga diberikan kepada semua kakitangan PGM dan Jab. Immunologi.

Buat teman-teman seperjuangan; Aziz, Che Ismail, Ina, Along, Ja dan Yulia, galakan dan bantuan anda semua amatlah dihargai. Terima kasih di atas segala-galanya. Hanya ALLAH yang membalas segala jasa dan budi baik kalian.

SENARAI PEMBENTANGAN KERTAS KERJA

Pembentangan kertas kerja oral:

1) Tajuk: Lineage assignment in lymphoma: Immunophenotyping by flow cytometry compared with immunohistochemistry.

Penulis: Khairani Idah Mokhtar, Nicholas Jackson, Meor Zamari Meor Kamal, Hasnan Jaafar, Abdul Aziz Baba, T. Kannan dan Ishak Mat.

Tempat: 3rd National Conference on Medical Sciences, Pusat Pengajian Sains Perubatan, Universiti Sains Malaysia.

Tarikh: 25-26 Mei, 1997.

2) Tajuk: Detection of immunoglobulin gene rearrangements in B-lineage Non-Hodgkin's lymphoma (NHL) using polymerase chain reaction (PCR)

Penulis: Khairani Idah Mokhtar, Abdul Aziz Baba, Mohd Nizam Isa, Meor Zamari Meor Kamal, Anim Zainuddin.

Tempat: 4th National Conference on Medical Sciences, Pusat Pengajian Sains Perubatan, Universiti Sains Malaysia.

Tarikh: 8-9 Jun, 1998.

3) Tajuk: Immunophenotypic analysis of lymphomas: Lineage assignment in lymphomas by flow cytometry compared with immunohistochemistry.

Penulis: Khairani Idah Mokhtar, Abdul Aziz Baba, Hasnan Jaafar dan Ishak Mat.

Tempat: Malaysian Society for Immunology: 3rd Scientific Meeting and Annual General Meeting. Pusat Pengajian Sains Perubatan, Universiti Sains Malaysia.

Tarikh: 8 Ogos, 1999.

4) Tajuk: Detection of clonal lymphoid population by IgH chain gene rearrangement and immunophenotyping in malignant lymphomas.

Penulis: K.I. Mokhtar, A.A. Baba, I. Mat, M.N. Isa.

Tempat: 1st Asean Conference on Medical Sciences, Organised by USM Dan Kerjasama IMT-GT (Indonesia-Malaysia-Thailand Growth Triangle). Renaissance Kota Bharu, Kelantan.

Tarikh: 18-21 Mei, 2001.

Pembentangan kertas kerja poster:

1) Tajuk: P53 immunohistochemical staining in Non-Hodgkin's lymphoma (NHL).

Penulis: Khairani Idah Mokhtar, Abdul Aziz Baba, Hasnan Jaafar, Meor Zamari Meor Kamal, Ishak Mat.

Tempat: 5th National Conference on Medical Sciences, Pusat Pengajian Sains Perubatan, Universiti Sains Malaysia.

Tarikh: 4-5 Mei, 1999.

2) Tajuk: Clinical significance of p53 protein expression in Non-Hodgkin's lymphoma among Malaysian patients.

Penulis: A. Baba, M. Khairani, H. Jaafar.

Tempat: ECCO 10: The European Cancer Conference, Vienna.

Tarikh: 12-16 September, 1999.

(Abstrak diterbitkan di dalam *The European Journal of Cancer*, Vol. 35 Supplement 4 (September): 1999)

SENARAI KANDUNGAN

Kandungan	Muka surat
TAJUK	
DEDIKASI	i
PENGHARGAAN	ii
SENARAI PEMBENTANGAN KERTAS KERJA	iii
SENARAI KANDUNGAN	v
SENARAI JADUAL	x
SENARAI RAJAH	xii
SENARAI GAMBARFOTO	xiv
ABSTRAK	xv
ABSTRACT	xvii
 BAB 1 PENGENALAN	 1
1.1 Epidemiologi limfoma secara umum	1
1.2 Malignansi limfoid	4
1.3 Perkembangan sel limfoid	5
1.3.1 Perkembangan sel limfosit B	5
1.3.2 Perkembangan sel limfosit T	9
1.4 Penyusunan semula gen imunoglobulin rantai berat (IgH) dan reseptor sel-T (TCR)	11
1.5 Pengelasan NHL dan sejarah tatanama	15
1.6 Kaedah baru dalam pengelasan limfoma	21
1.6.1 Analisis flow sitometri dalam penentuan lineaj NHL	21
1.6.1(a) Kaedah penyediaan sampel bagi analisis flow sitometri	25
1.6.1(b) Perbandingan di antara analisis flow sitometri dan imunohistokimia dalam pendiagnosan limfoma	28
1.6.1(c) Objektif kajian	29

1.6.2	Penggunaan kaedah tindak balas rantai polimerase (PCR) di dalam pengesanan penyusunan semula gen imunoglobulin rantai berat (IgH) dan reseptor sel-T (TCR) dalam NHL	29
1.6.2(a)	Aplikasi diagnosis dalam analisis penyusunan semula gen reseptor antigen	30
1.6.2(b)	Penggunaan kaedah biologi molekul dalam pengesanan penyusunan semula gen reseptor antigen	31
1.6.2(b)(i)	Kaedah pemblotan Southern	31
1.6.2(b)(ii)	Kaedah tindak balas rantai polimerase (PCR)	33
1.6.2(c)	Objektif kajian	36
1.7	Pengesanan pengekspresian protein p53 dan bcl-2 menggunakan kaedah pewarnaan imunohistokimia dalam NHL	37
1.7.1	P53 dan tumorigenesis	37
1.7.1(a)	Fungsi p53 dalam mengawal kerosakan DNA dan apoptosis	38
1.7.1(b)	Pengekspresian p53 pada tisu limfoma malignan	39
1.7.1(c)	Kaedah pengesanan pengekspresian p53 pada kanser manusia	42
1.7.2	Bcl-2 dan tumorigenesis	43
1.7.2(a)	Fungsi bcl-2 dalam mengawal survival sel dan apoptosis	45
1.7.2(b)	Pengekspresian bcl-2 pada tisu limfoma malignan	46
1.7.2(c)	Kaedah pengesanan pengekspresian bcl-2 pada kanser manusia	48
1.7.3	Objektif kajian	48
BAB 2 BAHAN DAN METODOLOGI AM		51
2.1	Bahan-bahan dan kaedah am ujian imunofenotip menggunakan kaedah flow sitometri	51
2.1.1	Larutan Hanks' Balance Salt solution (HBSS)	51
2.1.2	Larutan Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.4	51
2.1.3	Larutan 0.83% ammonium klorida (NH ₄ Cl)	51
2.1.4	Larutan fiksatif 1% dalam PBS	52
2.1.5	Larutan Ficoll-Hypaque (1.077g)	52
2.1.6	Senarai antibodi monoklon yang digunakan dalam ujian imunofenotip	53
2.2	Bahan-bahan dan kaedah am analisis molekul bagi ujian pengesanan penyusunan semula gen imunoglobulin rantai berat (IgH) menggunakan kaedah tindak balas rantai polimerase (PCR)	54
2.2.1	Pengekstrakan DNA daripada tisu menggunakan kit	54

	QIAamp (QIAGEN,USA)	
2.2.2	Larutan penimbal 10X TBE (Tris-Borate-EDTA)	55
2.2.3	Larutan penimbal pemuat 6X (6X loading buffer) (MBI-Fermentas, USA)	56
2.2.4	Larutan 10% ammonium persulfat (APS)	56
2.2.5	Larutan stok 40% akril/bis (Amresco, USA)	56
2.2.6	2% gel agarosa untuk analisis elektroforesis	57
2.2.7	8% gel poliakrilamida (PAGE) untuk analisis elektroforesis	57
2.3	Bahan-bahan dan kaedah am analisis pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodi monoklon p53 dan bcl-2 ke atas sampel hirisan tisu parafin	58
2.3.1	Larutan 0.01M penimbal sitrat pH 6.0 (0.01M Citrate Buffer, pH 6.0)	58
2.3.2	Larutan 0.05M Tris Buffered Saline (TBS), pH 7.6	59
2.3.3	Larutan pencair antibodi	59
2.3.4	Larutan 3% hydrogen peroksida dalam metanol	60
2.3.5	Larutan alkohol berperingkat	60
2.3.6	Larutan xylena	61
2.3.7	Larutan substrat kromogen DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride)	61
2.3.8	Larutan 1:10 Poly-L-Lysine (Sigma, USA)	61
2.3.9	Penyediaan sisip kaca	61
BAB 3	ANALISIS FLOW SITOMETRI MENGGUNAKAN SAMPEL TISU SEGAR SEBAGAI SUATU KAEDAH DALAM PENETAPAN LINEAJ NHL	63
3.1	Pendahuluan	63
3.1.1	Objektif kajian	64
3.2	Kaedah pewarnaan imunohistokimia pada hirisan tisu parafin	64
3.3	Bahan-bahan dan kaedah ujian imunofenotip menggunakan teknik flow sitometri	66
3.3.1	Kaedah penerimaan sampel tisu dan penyediaan ampaian sel tunggal	66
3.3.2	Penglabelan antibodi monoklon ke atas antigen permukaan sel	68
3.3.3	Penganalisaan data	70
3.4	Kriteria untuk penetapan lineaj NHL	73
3.5	Keputusan	75
3.5.1	Jenis sampel	75
3.5.2	Keputusan analisis flow sitometri	77
3.5.2(a)	Perbandingan di antara keputusan analisis flow sitometri dan analisis imunohistokimia	77

3.5.2(b)	Keputusan analisis flow sitometri menggunakan kriteria nisbah kappa:lambda >3.0 atau <0.25	80
3.5.2(c)	Keputusan analisis flow sitometri menggunakan kriteria majoriti pengekspresian antigen permukaan sel limfoid B	80
3.5.2(d)	Keputusan analisis flow sitometri menggunakan kriteria majoriti pengekspresian antigen permukaan sel limfoid T	81
3.6	Perbincangan	86
BAB 4	PENGESANAN PENYUSUNAN SEMULA GEN IMUNOGLOBULIN RANTAI BERAT (IGH) MENGGUNAKAN TINDAK BALAS RANTAI POLIMERASE (PCR) SEBAGAI SUATU KAEDAH PENGESANAN POPULASI MONOKLON DALAM NHL	96
4.1	Pendahuluan	96
4.1.1	Objektif kajian	97
4.2	Bahan-bahan dan kaedah menjalankan analisis biologi molekul bagi pengesanan penyusunan semula gen IgH menggunakan tindak balas PCR	98
4.2.1	Pengumpulan sampel	98
4.2.2	Pengekstrakan DNA	98
4.2.3	Kaedah tindak balas rantai polimerase (PCR)	101
4.2.3(a)	Tindak balas PCR untuk mengesan penyusunan semula gen imunoglobulin rantai berat (IgH)	101
4.2.3(b)	Pengesanan produk amplifikasi PCR	102
4.2.3(c)	Kaedah PCR untuk kawalan amplifikasi internal	104
4.2.3(d)	Pengesanan produk amplifikasi PCR	104
4.3	Keputusan	107
4.3.1	Keputusan amplifikasi PCR menggunakan primer V _H /J _H untuk mengesan penyusunan semula gen imunoglobulin rantai berat (IgH)	107
4.4	Perbincangan	114
BAB 5	PENGESANAN PENGEKSPRESIAN DAN TABURAN PROTEIN P53 DAN BCL-2 PADA TISU LIMFOMA MENGGUNAKAN KAEDAH PEWARNAAN IMUNOHISTOKIMIA	124
5.1	Pendahuluan	124
5.1.1	Objektif kajian	125
5.2	Bahan-bahan dan kaedah pengesanan pengekspresian protein p53 dan bcl-2 terhadap limfoma menggunakan	126

kaedah pewarnaan imunohistokimia	126
5.2.1 Jenis-jenis sampel yang digunakan untuk analisis imunohistokimia	126
5.2.2 Penyediaan sampel hirisan tisu pada sisip kaca	128
5.2.3 Kaedah pewarnaan imunoperoksidase menggunakan teknik kompleks strept avidin-biotin	128
5.2.4 Penentuan skor pewarnaan imunohistokimia bagi pengekspresian dan taburan protein p53 dan bcl-2 pada sampel tisu	130
5.2.5 Analisis statistik	131
5.3 Keputusan	133
5.3.1 Keputusan skor pewarnaan imunohistokimia bagi pengekspresian dan taburan protein p53 dan bcl-2 ke atas tisu limfoma yang telah dikelaskan sebagai NHL gred tinggi, gred pertengahan dan gred rendah	133
5.3.1(a) Keputusan pengekspresian dan taburan protein p53 pada kes NHL	133
5.3.1(b) Keputusan pengekspresian dan taburan protein bcl-2 pada kes NHL	140
5.3.1(c) Keputusan pengekspresian bersama protein p53 dan bcl-2 pada kes NHL gred tinggi, pertengahan dan rendah	146
5.4 Perbincangan	148
5.4.1 Pengesanan pengekspresian dan taburan protein p53 pada kes NHL	148
5.4.2 Pengesanan pengekspresian dan taburan protein bcl2 pada kes NHL	155
BAB 6 PERBINCANGAN KESELURUHAN	162
6.1 Ringkasan dan cadangan kajian selanjutnya	162
6.1(a) Bab 3	162
6.1(b) Bab 4	163
6.1(c) Bab 5	165
6.2 Kesimpulan keseluruhan	167
RUJUKAN	168

SENARAI JADUAL

Jadual	Muka surat
1.1 Pengelasan Updated Kiel	19
1.2 Sistem Pengelasan Working Formulation	20
2.1 Senarai antibodi monoklon dan jenis label berpendaflour yang digunakan untuk ujian analisis flow sitometri	53
3.1 Antibodi yang digunakan sebagai panel limfoma di dalam pewarnaan imunohistokimia untuk menentukan lineaj NHL setelah diagnosis dilakukan menggunakan pewarnaan H&E	65
3.2 Aturan tiub yang dimasukkan dengan antibodi monoklon yang digunakan dalam analisis imunofenotip	69
3.3 Bilangan sampel tisu nodus limfa yang digunakan di dalam analisis flow sitometri dan keputusan diagnosis akhir sampel tersebut	76
3.4 Perbandingan di antara keputusan yang diperolehi daripada analisis flow sitometri dan ujian histopatologi (HPE)	79
3.5 Keputusan analisis flow sitometri dibandingkan ujian histopatologi menggunakan kriteria nisbah kappa:lambda. Nilai positif pada analisis flow sitometri mewakili >50% pengekspresian sel limfoid terhadap antigen permukaan sel B atau sel T	83
3.6 Keputusan analisis flow sitometri dibandingkan dengan keputusan ujian histopatologi menggunakan kriteria majoriti pengekspresian antigen permukaan sel limfoid tanpa pengekspresian dominan imunoglobulin rantai ringan kappa atau lambda. Nilai positif mewakili >50% sel limfoid adalah positif terhadap penanda permukaan sel limfoid B atau T	84
3.7 Keputusan analisis flow sitometri dibandingkan dengan keputusan ujian histopatologi menggunakan kriteria majoriti pengekspresian antigen permukaan sel limfoid tanpa pengekspresian dominan imunoglobulin rantai ringan kappa atau lambda. Nilai positif mewakili >50% sel limfoid adalah positif terhadap penanda permukaan sel limfoid B atau T	85
4.1 Bilangan dan diagnosis akhir (HPE) sampel tisu yang digunakan dalam analisis biologi molekul	100

4.2	Jumlah volum reagen yang digunakan dalam setiap tindak balas PCR dan jumlah <i>master mix</i> yang disediakan untuk 10 tindak balas PCR	105
4.3	Suhu dan masa yang digunakan untuk tindak balas PCR	105
4.4	Bilangan sampel yang telah menunjukkan pengesanan penyusunan semula gen IgH menggunakan primer V _H dan J _H	109
5.1	Jenis dan bilangan sampel yang digunakan di dalam analisis imunohistokimia bagi pengesanan pengekspresian protein p53 dan bcl-2	127
5.2	Taburan pengekspresian protein p53 pada kes NHL	135
5.3	Frekuensi skor pengekspresian protein p53 pada sampel tisu limfoma yang telah dikelaskan sebagai NHL gred tinggi, gred pertengahan dan gred rendah mengikut sistem Pengelasan Working Formulation	136
5.4	Frekuensi pengekspresian positif dan negatif terhadap protein p53 pada kes NHL yang telah dikumpulkan sebagai NHL agresif dan NHL indolen	136
5.5	Taburan pengekspresian protein bcl-2 pada kes NHL	141
5.6	Frekuensi skor pengekspresian protein bcl-2 pada sampel tisu limfoma yang telah dikelaskan sebagai NHL gred tinggi, gred pertengahan dan gred rendah mengikut sistem Pengelasan Working Formulation	142
5.7	Frekuensi pengekspresian positif dan negatif terhadap protein bcl-2 pada kes NHL yang telah dikumpulkan sebagai NHL agresif dan NHL indolen	142
5.8	Kaitan di antara pengekspresian bersama p53 dan bcl-2 dengan kes NHL daripada gred yang berbeza	147

SENARAI RAJAH

Rajah	Muka surat
1.1 Peringkat perkembangan sel B serta penanda permukaan sel B yang diekspreskan semasa proses perkembangan tersebut	8
1.2 Peringkat pembezaan dan pembesaran sel T	10
1.3 Ilustrasi proses penyusunan semula gen imunoglobulin rantai berat (IgH)	14
1.4 Carta aliran menunjukkan kaedah utama yang terlibat di dalam kajian ini	50
3.1 Plot titik FSC melawan SSC menunjukkan taburan sel-sel mononukleus yang akan dipagar bagi penganalisaan data. FSC mewakili pembiasan cahaya ke hadapan akan menunjukkan saiz sel manakala SSC mewakili pembiasan cahaya dari sisi akan menunjukkan keadaan granulariti	71
3.2 Plot titik bagi sampel ampaian sel tunggal yang dilabelkan dengan antibodi isotip Ig G2a (FITC) dan Ig G1 (PE) sebagai tiub kawalan negatif	72
3.3 Carta aliran kaedah penerimaan sampel, penyediaan ampaian sel tunggal dan penglabelan antibodi monoklon ke atas antigen permukaan sel untuk analisis flow sitometri	74
3.4 Contoh keputusan pewarnaan positif terhadap antigen penanda permukaan sel limfoid CD 19 (93.75%) dan CD 10 (91%)	82
4.1 Ilustrasi lokasi primer V_H dan J_H . Gen imunoglobulin rantai berat (IgH) terletak pada kromosom 14q32. Kawasan "Complementary Determining Region III, CDRIII" terdiri daripada segmen-segmen rangkakerja 3 (Framework-3), pelbagai (Diversity, D) dan penyambung (Joining, J)	103
4.2 Carta aliran kaedah penerimaan sampel, pengekstrakan DNA dan analisis molekul untuk mengesan penyusunan semula gen imunoglobulin rantai berat	106
4.3 Analisis elektroforesis gel agarosa 2% ke atas DNA genomik yang telah diekstrakkan daripada sampel tisu menggunakan kit pengekstrakan DNA "QIAamp Tissue Kit" (QIAGEN, USA)	110

4.4	Analisis gel agarosa 2% ke atas produk PCR menggunakan primer kawalan amplifikasi internal (<i>RS42</i> dan <i>KM29</i>). Produk PCR diamplifikasikan pada saiz 500bp	111
4.5	Analisis elektroforesis gel poliakrilamida 8% (PAGE) ke atas produk PCR menggunakan primer V_H dan J_H untuk mengesan populasi monoklon yang mengalami proses penyusunan semula gen IgH pada sampel NHL-B.	112
4.6	Analisis gel poliakrilamida 8% (PAGE) ke atas produk PCR daripada kes-kes selain daripada NHL-B yang dikesan telah menghasilkan keputusan yang positif terhadap penyusunan semula gen IgH	113
5.1	Carta aliran kaedah penyediaan sampel hirisan tisu, pewarnaan imunohistokimia dan pemerhatian sel	132
5.2	Carta bar menunjukkan bilangan dan peratusan kes yang positif dan negatif terhadap pengekspresian protein p53 pada 53 kes NHL yang telah diklasifikasikan mengikut sistem Pengelasan Working Formulation	137
5.3	Carta bar menunjukkan bilangan dan peratusan kes yang positif dan negatif terhadap pengekspresian protein bcl-2 pada 53 kes NHL yang telah diklasifikasikan mengikut sistem Pengelasan Working Formulation	143

SENARAI GAMBARFOTO

Gambarfoto	Muka surat
5.1 Skor positif tinggi, 3+ (taburan tinggi) iaitu apabila lebih daripada 75% (>75%) sel malignan adalah positif.	138
5.2 Skor positif pertengahan, 2+ (taburan sederhana) iaitu apabila 26-75% sel malignan adalah positif.	138
5.3 Skor positif rendah, 1+ (taburan rendah) iaitu apabila kurang daripada 25% (<25%) sel malignan adalah positif.	139
5.4(a) dan 5.4(b) Skor negatif, ± atau –ve (negatif) iaitu apabila hanya beberapa sel adalah positif (<10%) atau tiada sel malignan positif (-ve).	139
5.5 Skor positif tinggi, 3+ (taburan tinggi) iaitu apabila lebih daripada 75% (>75%) sel malignan adalah positif.	144
5.6 Skor positif pertengahan, 2+ (taburan sederhana) iaitu apabila lebih 26-75% sel malignan adalah positif terhadap protein bcl-2.	144
5.7 Skor positif rendah, 1+ (taburan rendah) iaitu apabila kurang daripada 25% (<25%) sel malignan adalah positif	145
5.8(a) dan 5.8(b) Skor negatif, ± atau –ve (negatif) iaitu apabila hanya beberapa sel malignan (<10%) adalah positif atau tiada sel malignan yang positif (-ve).	145

ABSTRAK

Limfoma bukan Hodgkin (NHL) merupakan suatu keadaan malignansi yang heterogenus. Perkembangan terbaru kaedah-kaedah yang melibatkan bidang imunologi dan biologi molekul telah membantu pendiagnosan dan pengelasan NHL dilakukan dengan sempurna. Ciri-ciri pengekspresian protein seperti p53 dan bcl-2 juga memainkan peranan penting dalam sistem pengelasan limfoma. Terdapat tiga objektif utama dalam kajian ini. Pertama, melihat keberkesanan penggunaan analisis flow sitometri dalam melakukan penetapan lineaj terhadap NHL menggunakan sampel ampaian sel tunggal daripada tisu segar. Kedua, mengesan penyusunan semula gen imunoglobulin rantai berat (IgH) sebagai suatu kaedah pengesanan populasi monoklon pada kes NHL menggunakan kaedah tindak balas rantai polimerase (PCR). Objektif ketiga ialah melihat pengekspresian dan taburan protein p53 dan bcl-2 pada kes NHL gred yang berbeza menggunakan kaedah pewarnaan imunohistokimia.

Semua sampel yang digunakan dalam kajian ini telah diperolehi daripada pesakit-pesakit yang disyaki menghidap limfoma. Sebanyak 37 sampel nodus limfa segar digunakan untuk analisis flow sitometri. Penyediaan ampaian sel tunggal dilakukan dan sel-sel mononukleus dilabelkan dengan antibodi monoklon. Data dianalisa menggunakan alatan FacSCAN. Pengesanan penyusunan semula gen IgH menggunakan kaedah PCR telah dilakukan ke atas 43 sampel nodus limfa segar atau yang telah disejuk-bekukan. DNA diekstrakkan mengikut prosedur yang ditetapkan. PCR dijalankan menggunakan pasangan primer V_H/J_H. Populasi monoklon ditunjukkan oleh kehadiran jalur pada saiz di antara 90-160bp. Pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodi monoklon p53 (DO-7, DAKO) dan bcl-2 (klon 124, DAKO) telah dijalankan ke atas 56 sampel hirisan tisu parafin.

Melalui analisis flow sitometri, penetapan lineaj NHL dapat dilakukan pada 11/14 kes NHL-B dan 1 kes NHL-T. Melalui kaedah pengesanan penyusunan semula gen IgH, populasi monoklon telah diperhatikan pada 18 daripada 21 kes NHL-B, 2 kes NHL-T dan 2 kes penyakit Hodgkin manakala tiada populasi monoklon dikesan pada kes reaktif, metastatik karsinoma dan tuberkulosis. Pengekspresian protein p53 dan bcl-2 telah diperhatikan pada kes NHL daripada gred berbeza. Taburan pengekspresian yang positif terhadap protein p53 lebih kerap diperhatikan pada NHL gred pertengahan dan tinggi manakala pengekspresian bcl-2 adalah pada NHL gred pertengahan terutamanya yang berhistologi sel besar dan tersebar.

Keseluruhannya, penetapan lineaj melalui analisis flow sitometri dapat dilakukan pada kes NHL yang menunjukkan nisbah kappa:lambda yang abnormal di samping pengekspresian yang positif terhadap penanda permukaan sel limfoid B. Populasi monoklon dalam kes NHL-B dapat dikesan menggunakan kaedah pengesanan penyusunan semula gen IgH. Kaedah-kaedah ini boleh dijadikan sebagai kaedah tambahan kepada teknik imunohistopatologi dalam melakukan diagnosis dan penetapan lineaj pada kes-kes NHL. Pengekspresian protein p53 dan bcl-2 pada kes NHL dapat dikesan secara pewarnaan imunohistokimia. Kekerapan pengekspresian p53 pada kes NHL gred pertengahan/tinggi dan bcl-2 pada gred pertengahan mungkin boleh digunakan untuk menunjukkan tahap agresif sesuatu keadaan malignansi.

MOLECULAR GENETIC AND IMMUNOPHENOTYPIC ANALYSIS OF NON-HODGKIN'S LYMPHOMA IN KELANTAN

ABSTRACT

Non-Hodgkin's lymphoma (NHL) is a heterogeneous malignancy. Recent advancement in techniques in the field of immunology and molecular biology enables the diagnosis and classifications of NHL to be made satisfactorily. Protein expression criteria such as p53 and bcl-2 play an important role in classifying lymphoma. There are three main objectives in this study. First, to observe the effectiveness of flow cytometry analysis as a technique for lineage assignment in NHL using fresh single cell suspension samples. Second, to detect immunoglobulin heavy (IgH) chain gene rearrangement as a technique to identify monoclonal population in NHL cases by polymerase chain reaction (PCR). Third, to detect the expression and distribution of p53 and bcl-2 protein on different grades of NHL by immunohistochemistry technique.

Lymph node samples were obtained from patients suspected of having lymphoma. In flow cytometry analysis, single cell suspension were prepared from 37 lymph node samples, reacted with monoclonal antibodies and analysed using FACScan machine. Detection of IgH gene rearrangement was done using DNA extracted from 43 fresh or frozen lymph nodes and was subjected to PCR using V_H/J_H specific primer. Monoclonal population was represented by amplified band at 90-160bp. Immunohistochemistry staining was done using monoclonal antibodies p53 (DO-7) and bcl-2 (clone 124) on 56 paraffin embedded tissue sections.

Flow cytometry analysis had correctly assigned the lineage in 11/14 cases of confirmed NHL-B and 1 case of NHL-T. By doing PCR in detecting IgH gene rearrangement, monoclonal population was observed in 18/21 cases of B lineage NHL, 2 cases of NHL-T and 2 cases of Hodgkin's disease while none was observed in reactive, metastatic carcinoma and tuberculosis. P53 and bcl-2 protein expression was analysed in NHL from different grades. Positive p53 protein expression was observed more frequently in cases of NHL from intermediate and high grade while bcl-2 protein expression was observed frequently in intermediate grade NHL especially in diffuse large cell subtypes.

In conclusion, by flow cytometry analysis, lineage assignment could be assigned confidently on cases of B-NHL expressing abnormal kappa:lambda ratio and positive expression of B-cell surface markers. IgH gene rearrangement analysis could be used to show monoclonal population in cases of B lineage NHL. Thus, flow cytometry and detection of IgH gene rearrangement could be an adjunct to immunohistopathology in making diagnosis and assigning lineage in NHL. Immunohistochemistry analysis could detect the expression of p53 and bcl-2 protein in NHL. Frequent expression of p53 observed in intermediate/high grade NHL and bcl-2 in intermediate grade could be used to show levels of aggressiveness in this malignancy.

BAB 1

PENGENALAN

Semenjak 20 tahun yang lepas, penyakit kanser malignan telah dikenal pasti sebagai salah satu penyebab utama peningkatan kes kematian yang dicatatkan selepas penyakit jantung dan sistem pulmonari di Malaysia. Dalam tempoh 10 tahun dari tahun 1966 sehingga 1976, kadar kematian yang disebabkan oleh kanser telah meningkat di Semenanjung Malaysia dari 16.4 bagi 100,000 penduduk kepada 20.3 bagi 100,000 penduduk (Huat,1979), manakala mengikut laporan tahunan yang dikeluarkan oleh Kementerian Kesihatan Malaysia (1997), insiden penyakit kanser adalah sebanyak 150 bagi setiap 100,000 penduduk. Berdasarkan kepada kadar tersebut, dianggarkan terdapat 31,700 kes kanser di Malaysia pada tahun 1996 dan dianggarkan dalam tempoh 25 tahun akan datang, kes kanser akan meningkat sebanyak 25% di negara-negara maju dan 100% di negara-negara membangun. Di Malaysia, limfoma telah dikenal pasti sebagai salah satu daripada sepuluh kanser utama yang menyebabkan kematian di kalangan penduduk negara ini (Laporan KKM, 1997; Chai *et al.*, 1999).

1.1 Epidemiologi limfoma secara umum

Istilah limfoma merangkumi suatu keluarga penyakit yang mana pengekspresian primer malignansinya berlaku di dalam organ-organ limfoid seperti nodus limfa; di mana sel-sel limfosit berkembang, limpa dan tisu-tisu yang lain. Namun demikian, keadaan malignan ini juga boleh berlaku pada tapak ekstralimfatik seperti gastro-usus, tulang dan nasofarinks.

Limfoma terbahagi kepada dua jenis yang utama iaitu limfoma bukan Hodgkin (*Non-Hodgkin's Lymphoma*, NHL) dan penyakit Hodgkin (*Hodgkin's Disease*) yang mana kedua-dua jenis penyakit ini dapat dibezakan berdasarkan kepada ciri-ciri mikroskopik, imunofenotip dan genetik yang ditunjukkan oleh sel-sel limfosit malignan yang terdapat pada tisu-tisu yang telah disusupi oleh sel-sel kanser limfoma. NHL merupakan suatu keadaan proliferasi secara berklon sel-sel limfosit B dan T yang bermorfologi tipikal atau tidak tipikal di dalam organ-organ limfoid atau tisu-tisu lain manakala penyakit Hodgkin mewakili suatu keadaan gangguan malignansi yang dicirikan oleh sel Reed-Sternberg dan sel-sel Hodgkin.

Limfoma merupakan sejenis kanser malignan yang telah dikenal pasti sebagai salah satu kanser yang biasa didiagnos dan merupakan salah satu penyebab kematian di Amerika Syarikat. Walaupun kejadian kanser NHL hanya mewakili 5% daripada jenis-jenis kanser terbaru yang didiagnoskan, ianya telah muncul sebagai salah satu penyebab utama dalam peningkatan kes-kes kematian bagi lelaki dan wanita dalam lingkungan umur 35 tahun dan ke atas di Amerika Syarikat (Vose *et al.*, 1991). Keadaan peningkatan kes-kes kanser jenis NHL juga didapati bukan hanya berlaku di Amerika Syarikat, tetapi juga di negara-negara Eropah dan Asia Tenggara (Shih dan Liang, 1991). Di Thailand, peningkatan kes limfoma telah diperhatikan berlaku sebanyak 158.9% dari tahun 1980 hingga 1998 (Sukpanichnant *et al.*, 1998) manakala di Singapura, kejadian NHL didapati telah meningkat di kalangan penduduk berbangsa Melayu dan Cina di mana peningkatan ini adalah lebih jelas pada wanita dibandingkan dengan kaum lelaki (Seow *et al.*, 1996). Selain daripada peningkatan kes limfoma malignan, data-data yang dikeluarkan telah menunjukkan spektrum limfoma yang dialami oleh populasi di negara Asia adalah berbeza berbanding dengan negara barat. Secara keseluruhannya, apabila dibandingkan dengan negara barat, kejadian NHL gred tinggi dan gred pertengahan adalah lebih kerap

diperhatikan berbanding dengan kejadian NHL gred rendah manakala kejadian penyakit Hodgkin juga adalah kurang diperhatikan di kalangan negara-negara Asia seperti yang telah diperhatikan di Malaysia (Mancer, 1990), Singapura (Seow *et al.*, 1996) dan Thailand (Sukpanichnant *et al.*, 1998).

Laporan berkenaan kejadian limfoma di negara barat dan Asia telah banyak diterbitkan. Di Malaysia, kajian dan data berkenaan limfoma lebih tertumpu kepada penduduk di negeri kawasan pantai barat Semenanjung Malaysia serta Sabah dan Sarawak (Chai *et al.*, 1999; Peh, 2000) berbanding dengan negeri di pantai timur Semenanjung Malaysia seperti Kelantan. Walau bagaimanapun, spektrum kejadian limfoma di Kelantan; sepertimana yang diperhatikan di Hospital Universiti Sains Malaysia, adalah sama seperti yang diperhatikan di negeri lain seperti kejadian NHL yang lebih tinggi berbanding dengan penyakit Hodgkin dan peratusan kes NHL gred pertengahan/tinggi yang lebih kerap diperhatikan daripada NHL gred rendah (Aziz *et al.*, 1990; Jackson, data tidak diterbitkan).

Mengikut anggaran yang dikeluarkan oleh American Cancer Society, dalam tahun 1997 sahaja terdapat lebih kurang 61,100 kes-kes terbaru yang berkaitan dengan limfoma telah dilaporkan. Daripada jumlah tersebut, sebanyak 53,600 kes merupakan kes NHL dengan bilangan kematian sebanyak 23,800 kes manakala 7,500 kes lagi adalah penyakit Hodgkin dengan bilangan kematian sebanyak 1,480 kes. Penyakit NHL telah didapati meningkat sebanyak 80% semenjak dari tahun 1970-an tetapi kejadian penyakit Hodgkin didapati semakin menurun dalam tempoh yang sama. Memandangkan peningkatan kes-kes NHL adalah begitu signifikan berbanding dengan penyakit Hodgkin, maka kaedah pengesanan awal penyakit ini adalah penting untuk memastikan penyakit NHL dapat dikawal dan

dirawat menggunakan kaedah yang bersesuaian dengan jenis-jenis penyakit NHL yang dihidapi oleh pesakit-pesakit tersebut.

1.2 Malignansi limfoid

Malignansi limfoid merupakan suatu neoplasma yang dicirikan oleh proliferasi sel yang berasal dari tisu limfoid seperti sel limfosit serta sel prekursornya. Malignansi sel limfoid kebiasaannya menunjukkan keheterogenusan dalam fenotip sel yang terlibat dan keadaan ini membayangkan kepelbagaian sel-sel normal yang seumpama dengannya. Dengan adanya perkembangan dalam bidang imunologi dan imunogenetik, sel limfoid normal telah dapat dibezakan berdasarkan kepada pengekspresian antigen permukaan sel serta konfigurasi gen reseptor antigen. Memandangkan sel limfoma mempunyai persamaan dengan sel limfosit normal dari segi pengekspresian penanda permukaan sel, maka keadaan malignansi limfoid ini dapat dibezakan berdasarkan kepada ciri-ciri imunofenotip dan imunogenetik sel limfoid normal dari mana ianya berasal (Foon dan Todd, 1986). Oleh yang demikian, malignansi sel limfoid boleh dikelaskan berdasarkan kepada punca lineaj sel yang terlibat samada lineaj sel B atau T, peringkat pembezaan sel-sel yang terlibat dan kelakuan klinikal samada akut atau kronik.

Terdapat beberapa contoh malignansi limfoid yang telah dikenal pasti melalui pengekspresian antigen permukaan sel mempunyai kaitan dengan peringkat pembezaan sel-sel limfoid. Leukemia limfoblastik akut lineaj sel B (B-ALL) merupakan tumor yang berasal daripada sumsum tulang dan ianya terbit dari peringkat prekursor sel B. Neoplasma sel B yang terbit dari peringkat sel B matang adalah seperti NHL lineaj sel B, leukemia limfositik kronik lineaj sel B (B-CLL) dan leukemia sel berbulu (*hairy cell leukemia*). Tumor-tumor ini terbit daripada nodus limfa atau tapak ektranodal dan

kebiasannya dicirikan dengan beban tumor pejal. Seterusnya, tumor sel B yang dicirikan dengan sel plasma ialah penyakit mieloma multipel dan leukemia sel plasma. Manakala contoh malignansi limfoid yang melibatkan lineaj sel T ialah leukemia limfoblastik akut sel lineaj T (T-ALL) dan limfoma limfoblastik yang terbit dari peringkat prekursor sel T, kebiasaannya wujud dalam bentuk massa timus. Tumor yang melibatkan sel T matang pula adalah seperti limfoma sel-T periferi (PTCL), limfoma sel-T kutaneus (CTCL), limfoma limfositik kronik lineaj sel T (T-CLL), leukemia prolimfositik dan gangguan limfaproliferatif T γ (Gaidano dan Dalla-Favera, 1995).

Memandangkan majoriti kes NHL (90%) telah dikenal pasti terdiri daripada lineaj sel B dan kurang daripada 20% kes NHL adalah daripada lineaj sel T (Freedman dan Nadler, 1991), maka pengetahuan mengenai pengekspresian antigen permukaan sel pada peringkat pembezaan sel limfoid normal B dan T adalah penting untuk diketahui memandangkan ianya mempunyai kaitan dengan tahap prognosis dan rawatan pesakit limfoma.

1.3 Perkembangan sel limfoid

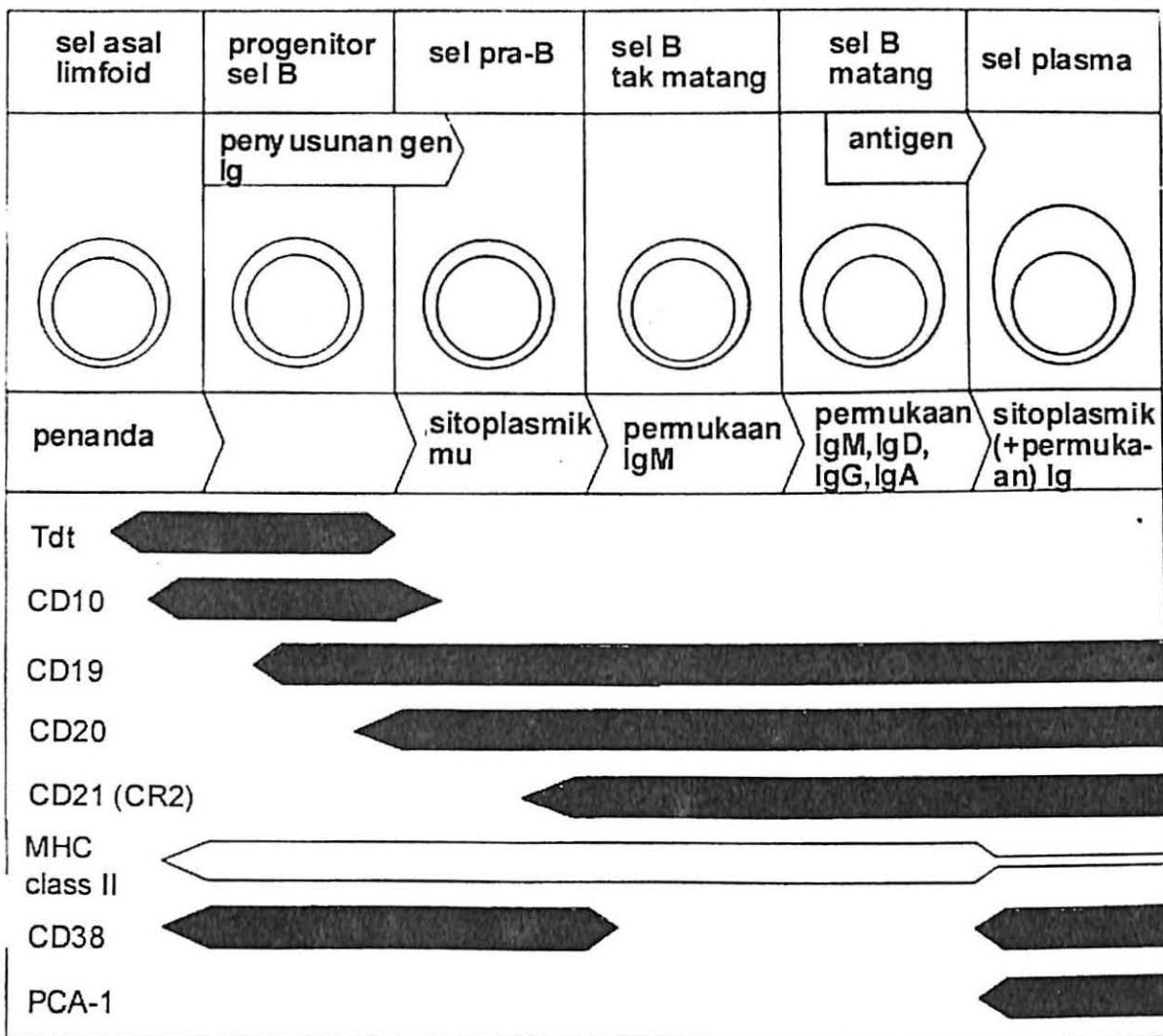
1.3.1 Perkembangan sel limfosit B

Proses perkembangan sel limfosit B terbahagi kepada dua fasa utama iaitu fasa tak bersandar antigen yang berlaku pada sumsum tulang dan fasa bersandar antigen yang berlaku pada organ periferi seperti nodus limfa dan limpa. Peringkat perkembangan dan pembezaan sel B telah dikenal pasti dengan adanya pengekspresian antigen permukaan dan sitoplasma sel yang berbeza-beza serta penyusunan semula gen imunoglobulin (Kuby, 1994).

Sel asal limfoid memerlukan enzim Tdt untuk berkembang ke peringkat progenitor sel B. Semasa peringkat progenitor sel B, proses penyusunan semula gen imunoglobulin rantai berat D_H kepada J_H mula berlaku tetapi tiada pengekspresian Ig dikesan. Seterusnya, dari peringkat progenitor sel, sel limfosit B akan berkembang kepada peringkat prekursor sel B (sel pra-B) yang dapat dicirikan dengan adanya pengekspresian antigen permukaan sel seperti MHC kelas II (HLA-DR), CD 19 dan CD 38 manakala gen rantai berat $Ig\mu$ mula diekspreskan di sitoplasma. CD 19 merupakan penanda permukaan sel pada peringkat sel pra-B yang paling dipercayai dalam membuktikan lineaj sel limfosit B. Selain daripada CD 19 dan CD 38, sejenis antigen terbatas sel B iaitu CD 22 juga diekspreskan di dalam sitoplasma (cCD22) pada peringkat awal sel pra-B. Sel pra-B seterusnya akan mengekspreskan penanda permukaan CD 20. Seterusnya, CD 10 (CALLA) juga akan diekspreskan pada permukaan sel limfoid. Peringkat akhir sel pra-B dikesan dengan adanya CD 21 dan pengekspresian rantai berat Ig mu (μ) pada sitoplasma tanpa pengekspresian rantai ringan. Pada peringkat awal sel B (sel-B tak matang), pengekspresian CD 10 dan CD 38 mula hilang. Proses pembezaan sel B tak-matang seterusnya akan menghasilkan pengekspresian IgD dan IgM pada membran sel. Proses ini seterusnya akan mencirikan sel B matang.

Sel B matang akan dikeluarkan dari sumsum tulang ke aliran darah periferi dan tisu limfoid sekunder di mana proses perkembangan sel B yang seterusnya berlaku memerlukan kehadiran antigen. Fasa kedua ini dikenali sebagai fasa bersandar antigen. Sel B matang rehat mengekspreskan beberapa penanda permukaan seperti sIgM/D, HLA DR, CD 19, CD 20, CD 24 dan CD 22 tetapi tidak CD 10. Apabila sel B matang dirangsang oleh antigen, ianya akan menjadi teraktif dan berproliferasi. Sel B teraktif akan mengalami proses penukaran kelas Ig yang akan menghasilkan pengekspresian isotip selain daripada

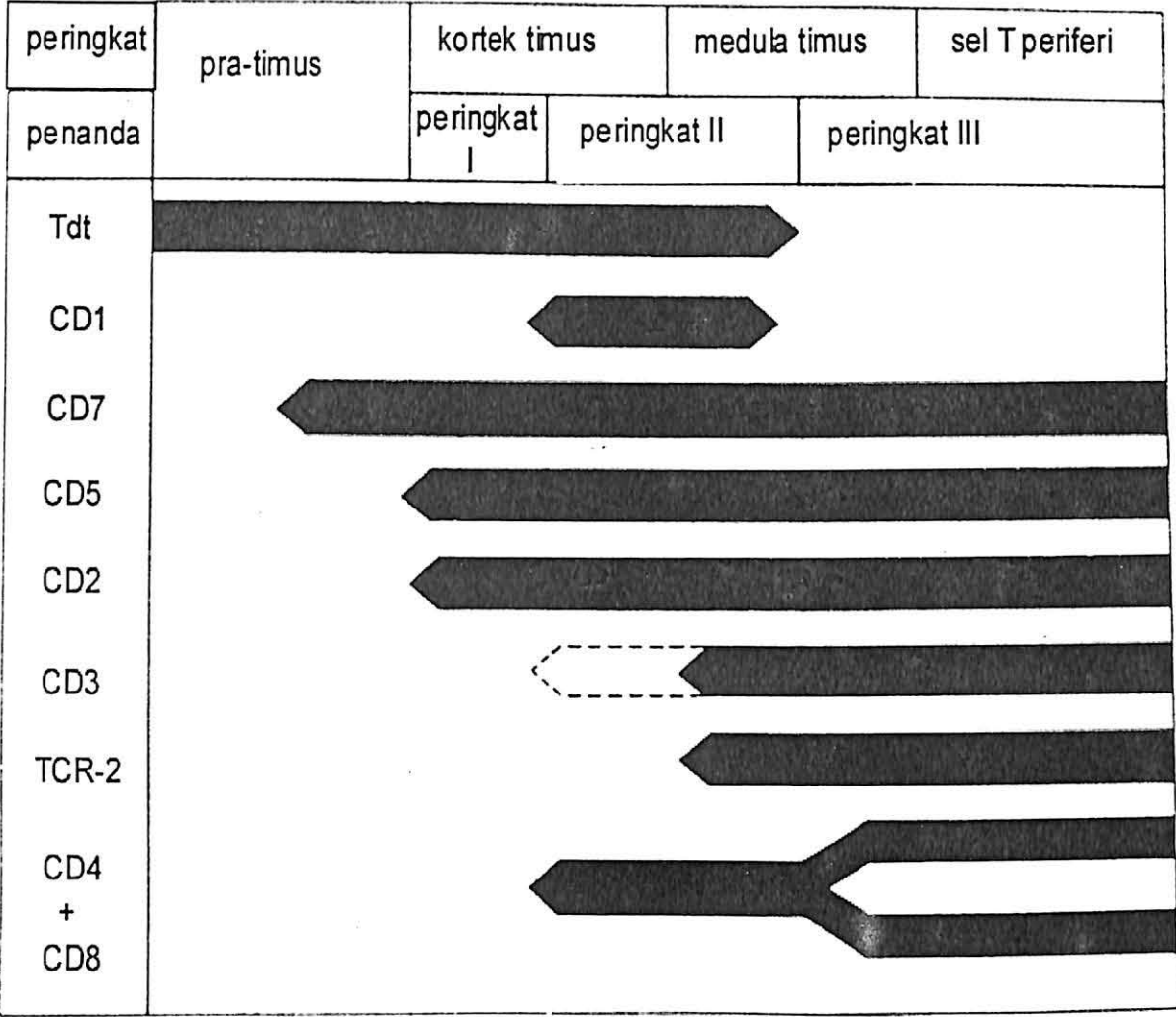
IgM dan IgD pada membran sel B. Selain daripada itu, peringkat sel B teraktif juga disertai oleh suatu turutan penukaran antigen permukaan sel seperti kehilangan pengekspresian sIgD, CD 21 dan CD 22 dalam tempoh 72 hingga 96 jam. Sewaktu kehilangan pengekspresian antigen permukaan ini, terdapat beberapa antigen terbatas sel B dihasilkan pada permukaan sel B seperti CD 25, CD 5 dan CD 23. Sejurus selepas peringkat pengaktifan, sel B berkembang menjadi sel plasma dan mempunyai keupayaan untuk merembeskan Ig serta mengalami penukaran kelas Ig rantai berat sebagai tindak balas terhadap sitokin yang pelbagai. Sel B teraktif juga akan berkembang untuk menghasilkan sel ingatan yang mempunyai pengekspresian IgG, IgA atau IgE pada membran sel. Progeni untuk klon khusus ini berterusan selama beberapa tahun dalam keadaan dorman. Pada peringkat sel plasma, beberapa antigen permukaan sel seperti CD 38 dan PCA-1 telah diekspreskan pada sel plasma. Peringkat sel plasma merupakan peringkat terakhir perkembangan sel B yang akan merembeskan molekul-molekul antibodi secara aktif (rajah 1.1) (Freedman dan Nadler, 1991).



Rajah 1.1 Peringkat perkembangan sel B serta penanda permukaan sel B yang diekspreskan semasa proses perkembangan tersebut. Sel asal limfoid memerlukan Tdt untuk berkembang kepada progenitor sel B, di mana penyusunan semula gen Ig mula berlaku. Dalam peringkat sel pra-B, gen rantai mu (μ) mula dikesan pada sitoplasma, seterusnya pada peringkat awal sel B (sel B tak matang), IgM dapat dikesan pada permukaan sel dan IgD dikesan pada sel B matang. Sel B matang seterusnya mula berkembang kepada sel plasma, di mana Ig mula dikesan pada sitoplasma disertai dengan proses penukaran isotip kepada IgG atau IgA. PCA-1 merupakan antigen permukaan sel plasma. Dari Roitt I, Brestoff J, Male D: Immunology, Ed 2, ms 14.7. St Louis, C.V. Mosby, 1989. (Aisenberg, 1991).

1.3.2 Perkembangan sel limfosit T

Perkembangan sel limfosit T memerlukan sel asal limfoid berhijrah dari sumsum tulang ke kelenjar timus. Keadaan persekitaran mikro dalam kelenjar timus dapat membantu proses perkembangan dan pembezaan sel T berlaku. Terdapat 3 peringkat pembezaan sel T intratimik yang berlaku dan boleh dikenal pasti melalui pengekspresian antigen permukaan sel. Enzim Tdt adalah diperlukan pada peringkat awal pembezaan sel intratimik disertai oleh pengekspresian antigen permukaan sel seperti CD 2, CD 7 dan CD 38. Peringkat kedua sel timosit dicirikan dengan pengekspresian CD 1 serta pengekspresian bersama CD 4 dan CD 8. CD 4 terlibat di dalam pengawalan pengaktifan sel T dan juga pengawalan kepada antigen kelas II MHC manakala CD 8 juga terlibat dalam interaksi dengan produk MHC serta mengawal pembesaran sel T. Populasi sel timosit pada peringkat kedua ini akan mengekspreskan CD 1, CD 2, CD 4, CD 7, CD 5 dan CD 38. Peringkat ketiga merupakan peringkat sel T matang yang mana pada ketika ini, sel T akan kehilangan pengekspresian CD 1 manakala pengekspresian CD 3, CD 5 dan CD 6 adalah diperlukan. Sejajar dengan pengekspresian CD 3, sel limfosit T juga akan mengekspreskan antigen reseptor sel-T (TCR). Kompleks CD 3/TCR dapat mengenali antigen sebagai antigen kelas II MHC. Sel limfosit T matang yang berhijrah dari kelenjar timus ke dalam darah periferi tidak lagi mengekspres CD 38 tetapi sel-sel limfosit tersebut akan terasing kepada sel limfosit T yang mengekspreskan samada CD 4 atau CD 8 yang mana 60-70% daripada sel limfosit mengekspreskan CD 4 manakala 30-40% sel limfosit T mengekspreskan CD 8 (Freedman dan Nadler, 1991) (rajah 1.2).



Rajah 1.2 Peringkat pembezaan dan pembesaran sel T. Tdt terdapat pada sel asal timus sehingga ke peringkat III tetapi hilang di dalam medula timus. CD1 terdapat pada timosit kortikal peringkat II tetapi hilang di dalam medula. CD2 dan CD7 dikesan pada peringkat awal pembezaan sel dan terdapat pada sel T matang. CD5 juga muncul pada peringkat awal pembezaan sehingga ke peringkat matang. CD3 muncul di dalam sitoplasma sel pada awal peringkat II (garis titik) dan diekspreskan pada permukaan sel bersama-sama TCR-2 (reseptor sel T- α/β). CD4 dan CD8 dikesan pada sel semasa peringkat II,manakala salah-satu akan hilang semasa proses pembezaan yang seterusnya. Dari Roitt I, Brestoff J, Male D: Immunology, Ed 2, ms 14.5. St Louis, C.V. Mosby, 1989. (Aisenberg, 1991).

Selain daripada pengekspresian antigen permukaan sel yang dapat menerangkan tentang lineaj sel limfoid yang terlibat dalam kes NHL, pengetahuan dalam bidang imunogenetik terutamanya berkenaan proses penyusunan semula gen imunoglobulin rantai berat (IgH) dan reseptor sel-T (TCR) juga telah membantu pengelasan NHL dilakukan dengan lebih sempurna. Selain daripada itu, pengesanan penyusunan semula gen IgH dan TCR juga dapat membezakan keadaan populasi neoplastik daripada populasi normal.

1.4 Penyusunan semula gen imunoglobulin rantai berat (IgH) dan reseptor sel-T (TCR)

Sel-sel limfosit merupakan sel-sel yang unik kerana berupaya untuk menjalani proses penyusunan somatik bagi gen-gen imunoglobulin dan reseptor sel-T. Proses penyusunan semula gen-gen imunoglobulin yang dihasilkan oleh sel B dan gen reseptor sel-T yang dihasilkan oleh sel T adalah penting dalam proses penghasilan molekul reseptor antigen yang pelbagai bagi memastikan ianya berupaya untuk bertindak balas dengan pelbagai antigen asing.

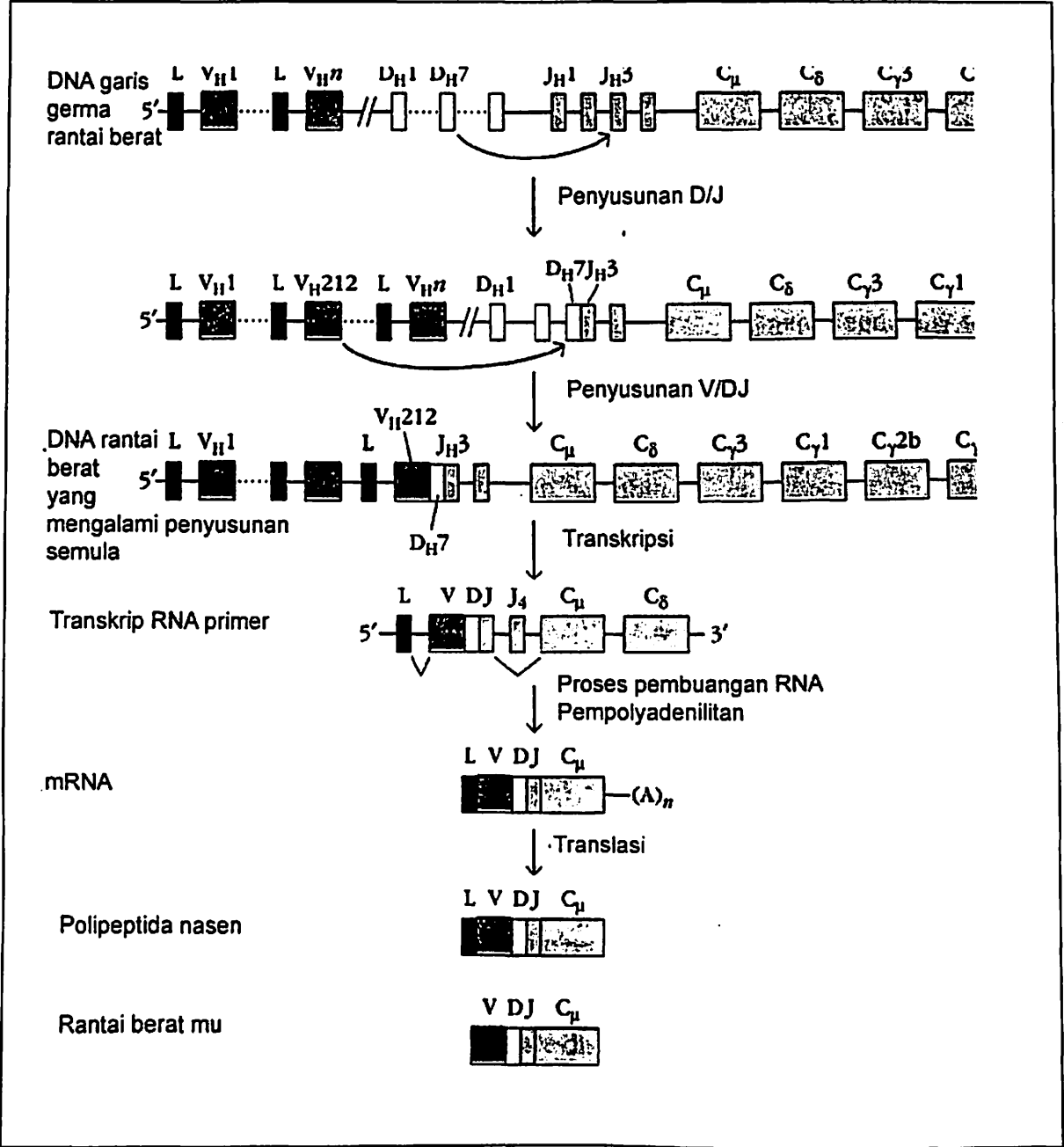
Molekul imunoglobulin terdiri daripada dua gen rantai berat yang seiras yang menentukan lima kelas rantai berat yang berlainan iaitu μ , δ , γ , ϵ dan α ; yang akan membentuk IgM, IgD, IgG, IgE dan IgA, dan dua gen rantai ringan yang sama dan seiras; iaitu samada kappa (κ) atau lambda (λ). Molekul reseptor sel-T terdiri daripada satu subunit α/δ , subunit β dan subunit γ . Gen-gen yang mengekodkan molekul imunoglobulin dan reseptor sel-T terletak pada beberapa kromosom yang berlainan seperti gen imunoglobulin rantai berat terletak pada lokus 14q32, gen imunoglobulin rantai ringan κ terletak pada lokus 2p11 dan lokus gen imunoglobulin rantai ringan λ ialah pada 22q1. Manakala gen rantai sel T α δ

terletak pada lokus 14q1, gen rantai sel T β terletak pada lokus kromosom 7q34 manakala lokus gen rantai sel T γ ialah pada 7p15. Molekul reseptor antigen ini terdiri daripada beberapa kombinasi gen-gen yang berbeza seperti gen variabel (V; *variable*), gen pelbagai (D; *diversity*), gen penyambung (J; *joining*) dan gen malar (C; *constant*).

Proses penyusunan semula gen imunoglobulin dan penghasilan molekul antibodi secara umumnya adalah terbatas kepada sel lineaj B sahaja, oleh yang demikian penyusunan gen imunoglobulin rantai berat dan rantai ringan κ atau λ biasanya tidak berlaku pada sel-sel bukan B. Manakala bagi sel limfosit T, proses penyusunan semula gen juga berlaku melibatkan gen-gen yang mengekodkan reseptor-antigen sel T $\alpha\beta$ dan $\gamma\delta$. Sewaktu perkembangan sel limfosit, proses penyusunan semula segmen gen kawasan V, D dan J berlaku pada loci reseptor-antigen yang melibatkan DNA pada sel-sel germa. Ianya dimulakan oleh kombinasi salah satu salinan gen D yang terdapat pada kromosom tersebut dengan salah satu salinan gen J untuk menghasilkan rekombinasi segmen gen D-J. Seterusnya, satu salinan gen kawasan V akan bergabung dengan kombinasi D-J untuk menghasilkan rekombinasi V-DJ. Jujukan nukleotida yang berada di antara kawasan rekombinasi gen-gen tersebut sebelum proses penyusunan berlaku adalah dipotong dan dibuang melalui mekanisme yang tertentu. Memandangkan gen V membawa jujukan nukleotida yang berbeza di antara satu sama lain, maka proses rekombinasi gen V dengan salah satu gen J dan D akan menghasilkan suatu sistem kombinasi jujukan nukleotida yang pelbagai dan berbeza serta menambahkan kepelbagaian dalam penghasilan molekul reseptor-antigen. Setelah kombinasi gen-gen V-DJ terhasil, maka suatu proses transkripsi gen akan berlaku untuk menghasilkan bebenang transkrip RNA primer diikuti oleh proses pembuangan intron yang mana proses ini akan membuang

jujukan nukleotida yang berada di antara kawasan kombinasi V-DJ dan C. Bebenang mRNA yang matang akan terhasil dan digunakan untuk proses terjemahan subunit molekul reseptor-antigen (rajah 1.3) (Kuby, 1994).

Proses penyusunan DNA merupakan suatu proses yang cenderung kesilapan. Proses ini boleh menghasilkan gen reseptor-antigen yang tidak berfungsi yang mungkin disebabkan oleh kegagalan suatu mekanisma rekombinasi untuk menyusun elemen-elemen V, D dan J atau disebabkan oleh penghasilan rangka bacaan yang mengandungi kodon tak bererti pada templat DNA yang digunakan untuk sintesis subunit reseptor-antigen. Oleh yang demikian, sekiranya sesuatu kesilapan berlaku semasa proses penyusunan gen pada alel yang pertama, maka sel limfosit B dan T mempunyai peluang untuk melakukan proses penyusunan gen pada alel yang kedua. Bagi gen imunoglobulin, proses penyusunan gen berlaku pada gen rantai berat, sekiranya proses ini berjaya, maka proses penyusunan semula gen rantai ringan kappa akan berlaku pada kedua-dua bahagian molekul imunoglobulin. Sekiranya proses ini gagal, maka proses penyusunan semula gen bagi rantai ringan lambda akan berlaku (Stewart dan Schwartz, 1994). Bagi reseptor sel-T, proses penyusunan gen melibatkan gen bagi subunit gamma dan delta, seterusnya diikuti oleh gen subunit beta dan alfa. Penyusunan losi gamma dan delta yang produktif akan menghasilkan reseptor sel-T $\gamma\delta$; tetapi sekiranya proses tersebut tidak berhasil, maka proses penyusunan losi alfa dan beta akan berlaku untuk menghasilkan reseptor sel-T $\alpha\beta$. Memandangkan kespesifikan sesuatu subunit reseptor antigen adalah bergantung kepada kombinasi tertentu segmen gen V kepada kawasan D dan J, maka konfigurasi DNA segmen V-D-J dan kawasan C selepas proses penyusunan pada setiap subunit alel



Rajah 1.3 Ilustrasi proses penyusunan semula gen imunoglobulin rantai berat (IgH). Diadaptasi daripada Kuby, 1994.

merupakan suatu penanda spesifik bagi setiap individu sel limfosit atau klon yang mungkin dihasilkan daripada limfosit tersebut.

Dengan adanya perkembangan dalam bidang imunologi dan genetik molekul, ianya dapat membantu sistem pengelasan NHL dilakukan dengan lebih berkesan dan sempurna.

1.5 Pengelasan NHL dan sejarah tatanama

Sejarah pengelasan tatanama NHL kepada sub-jenis yang lebih spesifik telah bermula semenjak dari dahulu lagi. Penggunaan istilah limfoma malignan telah digunakan oleh Billoth pada tahun 1871; walaupun pada tahun sebelumnya, Virchow 1864 dan Cohnheim 1865, telah menggunakan istilah limfosarkoma dan pseudoleukemia untuk menerangkan keadaan gangguan pada nodus limfa yang tidak disebabkan oleh leukemia. Istilah limfoma malignan yang digunakan oleh Billoth pada waktu tersebut termasuklah penyakit NHL seperti yang diketahui pada hari ini, penyakit Hodgkin dan penyakit limfadenopati reaktif. Semenjak dari itu, pelbagai usaha telah dilakukan untuk membezakan gangguan proliferasif kepada reaktif dan neoplastik, penyakit Hodgkin daripada NHL dan seterusnya untuk mengklasifikasikan penyakit NHL kepada subkelas-subkelas yang lebih spesifik (Aisenberg, 1991).

Semenjak dari tahun 1940-an, terdapat beberapa sistem pengelasan limfoma yang telah diterima pakai oleh ahli patologi dan klinikal. Di antaranya ialah sistem Pengelasan Gall dan Malory yang telah diperkenalkan pada tahun 1942, sistem Pengelasan Rappaport yang diperkenalkan pada tahun 1956 dan sistem Pengelasan Lukes-Collins dalam tahun 1974. Sistem Pengelasan Rappaport merupakan sistem yang agak relevan secara klinikal

kerana ianya dapat memberikan prognosis yang lebih signifikan selain daripada dapat membezakan dengan nyata antara penyakit Hodgkin dan NHL. Di dalam sistem ini, dua kriteria telah digunakan untuk membezakan sub-jenis limfoma iaitu saiz sel yang terlibat dan kehadiran corak bernodul pada sampel-sampel tersebut. Walaupun sistem ini telah diterima pakai oleh kebanyakan ahli klinikal di Amerika Syarikat, ianya masih lagi mempunyai beberapa kelemahan kerana sistem ini tidak mengambil kira penglibatan sistem imun dalam penghasilan sel-sel limfosit iaitu sel B dan sel T. Sistem Pengelasan Lukes-Collins juga telah didapati memberi sumbangan yang berguna dalam sejarah perkembangan pengelasan limfoma pada hari ini. Pengelasan Lukes-Collins telah membezakan sel limfosit B dan T berdasarkan kepada morfologi dengan menggunakan kaedah imunologi selain daripada mengambil kira keadaan sel folikel pusat yang menghasilkan sel kecil merekah (*small cleaved*), sel besar merekah (*large cleaved*), sel kecil tak-merekah (*small non-cleaved*) dan sel besar tak-merekah (*large non-cleaved*).

Seterusnya, dengan adanya perkembangan yang lebih mendalam dalam bidang imunologi dan perkembangan penggunaan alatan mikroskop elektron, kaedah pewarnaan imunositokimia dan teknik roset, ianya telah dapat membantu Lennert dalam memperluaskan sistem pengelasan limfoma. Sistem Pengelasan Kiel, 1974 telah membahagikan limfoma kepada dua gred malignansi, iaitu malignansi gred rendah dan malignansi gred tinggi berdasarkan kepada morfologi sel dan lekuk hayat pesakit. Morfologi sel adalah berdasarkan komposisi sel-sel pada tisu malignan samada terdiri dari sel-sel kecil atau sel-sel besar tertransform dan samada berasal dari sel-sel folikel pusat atau dari sel limfoid yang lain. Setelah pengetahuan dalam bidang imunologi dan kaedah biologi molekul semakin berkembang sistem Pengelasan Kiel telah dikemaskinikan dan dikenali sebagai Updated Kiel Classification. Dalam sistem ini, pembahagian antara sel B

dan sel T limfosit kepada malignansi gred rendah dan gred tinggi telah dilakukan (Norton, 1996) (jadual 1.1).

Memandangkan semua sistem pengelasan yang wujud pada waktu tersebut tidak dapat memenuhi setiap kriteria yang diperlukan dalam mendiagnoskan jenis-jenis penyakit NHL dengan jangka hayat pesakit, maka satu sistem pengelasan yang lebih terperinci dan memenuhi ciri-ciri histologi dan klinikal telah dicadangkan dan dikenali sebagai National Cancer Institute Working Formulation (NCI Working Formulation). Sistem pengelasan ini telah digunakan secara meluas di Amerika Syarikat di mana sistem ini telah membahagikan limfoma kepada gred rendah, gred pertengahan dan gred tinggi berdasarkan kepada kaitan di antara corak pembesaran dan ciri-ciri sitologi individu dengan survival (Norton, 1996) (jadual 1.2).

Semenjak sistem Pengelasan Working Formulation digunakan, terdapat beberapa percubaan yang telah dilakukan untuk terus mengklasifikasikan NHL kepada jenis kanser yang lebih spesifik. Keadaan ini telah menyebabkan satu sistem pengelasan yang baru ditubuhkan dan dikenali sebagai sistem Pengelasan REAL (Revised European-American Lymphoma Classification) (Harris *et al.*, 1994). Sistem ini telah dirancang dengan mengambil kira sistem Pengelasan Kiel dan Working Formulation sebagai rujukan dan perbandingan. Dalam melakukan pengelasan limfoma, sistem REAL telah menggunakan ciri-ciri morfologi, imunologi dan kaedah genetik selain daripada ciri-ciri klinikal dan hubungan sesuatu jenis limfoma dengan sistem imun normal; iaitu peringkat pembezaan dan perkembangan sesuatu sel limfosit, untuk mengenal pasti dan membezakan sesuatu jenis limfoma dari yang lain. Walaupun terdapat beberapa kekurangan dalam pengelasan sesuatu entiti, sistem ini dikatakan berjaya untuk menghasilkan suatu pengelasan yang

boleh diterima pakai secara lebih meluas dan mempunyai nilai prognostik yang lebih signifikan. Terbaru, sistem Pengelasan WHO yang berdasarkan kepada sistem Pengelasan REAL juga telah mula diperkenalkan. Sistem ini dikatakan dapat membantu pengelasan limfoma dilakukan dengan lebih berkesan (Norton, 1996).

Jadual 1.1 Pengelasan Updated Kiel (Norton, 1996)

Sel B	Sel T
Limfoma malignan gred rendah	
Limfositik (Lymphocytic) Leukemia limfositik kronik <i>(Chronic lymphocytic leukaemia)</i> Leukemia prolifimfositik <i>(Prolymphocytic leukaemia)</i> Leukemia sel berbulu <i>(Hairy cell leukaemia)</i> Limfoplasmasitik/-sitoid (imunositoma) <i>(Lymphoplasmacytic/-cytoid) (immunocytoma)</i> Plasmasitik (Plasmacytic) Sentroblastik-sentrositik <i>(Centroblastic-centrocytic)</i> Folikel ± tersebar (Follicular ± diffuse) Tersebar (Diffuse) Sentrositik (Centrocytic) (Sel mantel) (mantle cell) Monositoid, termasuk zon marginal <i>(Monocytoid, including marginal zone)</i>	Limfositik (Lymphocytic) Leukemia limfositik kronik <i>(Chronic lymphocytic leukaemia)</i> Leukemia prolifimfositik <i>(Prolymphocytic leukaemia)</i> Sel kecil, serebriform (Small cell, cerebriform) Mikosis fungoides, Sindrom Sezary <i>(Mycosis fungoides, Sezary's syndrome)</i> Limfoepithelioid (Limfoma Lennert) <i>(Lymphoepithelioid (Lennert's lymphoma))</i> Angioimunoblastik (AILD, LgX) <i>(Angioimmunoblastic (AILD, LgX))</i> Pleomorfik, sel kecil (HTLV-1±) <i>Pleomorphic, small cell (HTLV-1±)</i>
Limfoma malignan gred tinggi	
Sentroblastik (Centroblastic) Imunoblastik (Immunoblastic) Limfoma Burkitt (Burkitt's lymphoma) Sel besar anaplastik (Ki-+) (Large cell anaplastic (Ki-+)) Limfoblastik (Lymphoblastic)	Pleomorfik, sel bersaiz sederhana dan besar (HTLV-1±) Pleomorphic, medium-sized and large cell (HTLV-1±) Imunoblastik (HTLV-1±) (Immunoblastic (HTLV-1±)) Sel besar anaplastik (Ki-1+) (Large cell anaplastic (Ki-1+)) Limfoblastik (Lymphoblastic)
Jenis-jenis yang jarang dijumpai (Rare types)	

Jadual 1.2 Sistem Pengelasan Working Formulation (Norton, 1996)

Pengelasan International Working Formulation

Gred Rendah (*Low Grade*)

- A) Limfositik/ leukemia limfositik kronik (*Small lymphocytic/Chronic lymphocytic leukemia*)**
- B) Sel kecil merekah, berfolikel (*Follicular, small cleaved cell*)**
- C) Campuran sel kecil dan besar, berfolikel (*Follicular, mixed small and large cell*)**

Gred Pertengahan (*Intermediate Grade*)

- D) Sel besar, berfolikel (*Follicular, large cell*)**
- E) Sel kecil merekah, tersebar (*Diffuse, small cleaved cell*)**
- F) Campuran sel kecil dan besar, tersebar (*Diffuse, mixed small and large cell*)**
- G) Sel besar, tersebar (*Diffuse, large cell*)**

Gred Tinggi (*High Grade*)

- H) Sel besar, imunoblastik (*Large cell immunoblastic*)**
- I) Limfoma limfoblastik (*Lymphoblastic lymphoma*)**
- J) Sel kecil tak-merekah, Burkitt's atau bukan-Burkitt's (*Small non-cleaved cell, Burkitt's or non Burkitt's*)**

1.6 Kaedah baru dalam pengelasan limfoma

Kebanyakan sistem pengelasan yang diterima pakai telah mengaplikasikan pengetahuan imunologi menggunakan kaedah pewarnaan penanda antigen permukaan sel terutamanya dengan adanya penghasilan antibodi monoklon yang spesifik pada sel-sel tertentu untuk menentukan jenis sel limfoid yang terlibat dalam limfoma (Picker *et al.*, 1987). Penggunaan kaedah analisis flow sitometri dalam melakukan penetapan lineaj sel pada kes limfoma selain daripada perkembangan teknik biologi molekul dalam mengesan penyusunan semula gen imunoglobulin (Ig) rantai berat dan reseptor sel T telah dapat membantu sistem pengelasan dilakukan dengan lebih sistematik seterusnya diagnosis dapat diberikan dengan lebih sempurna. Selain daripada itu, penggunaan antibodi monoklon yang dapat mengesan kehadiran protein tertentu pada sel malignan dan normal seperti antibodi monoklon p53 dan bcl-2 juga dapat digunakan sebagai petunjuk berkenaan dengan tahap sesuatu malignansi serta membezakan suatu keadaan neoplastik daripada reaktif. Keadaan ini juga telah dapat membantu diagnosis dilakukan dengan lebih sempurna dan dalam masa yang lebih cepat.

1.6.1 Analisis flow sitometri dalam penentuan lineaj NHL

Di dalam artikel yang bertajuk “Immunophenotypic criteria for the diagnosis of Non-Hodgkin's Lymphoms”, Picker *et al.* (1987), telah menyatakan bahawa kaedah pengesanan dan analisis kuantitatif antigen pada permukaan sel boleh membantu pendiagnosan dan pengelasan bagi sesuatu kes gangguan limfaproliferatif dilakukan. Mereka telah menggunakan kaedah pewarnaan imunohistokimia pada hirisan tisu-tisu

limfoma yang telah disejuk-bekukan. Penggunaan antibodi monoklon yang spesifik terhadap antigen permukaan sel atau intraselular yang tertentu dalam keadaan gangguan limfaproliferatif telah menyebabkan pengekspresian sesuatu antigen secara abnormal atau kehilangan pengekspresian antigen tersebut dapat dikesan; dengan menggunakan kaedah imunohistokimia, lokasi dan morfologi sel-sel yang bertindak balas dengan antibodi tersebut dapat diperhatikan dan seterusnya pendiagnosan dan pengelasan tahap penyakit dapat dilakukan. Namun demikian, kaedah pewarnaan imunohistokimia menggunakan teknik imunoperoksidase terhadap tisu hirisan paraffin atau tisu hirisan sejuk-beku mengambil masa yang agak lama untuk diselesaikan. Oleh yang demikian, perkembangan kaedah flow sitometri dalam ujian imunofenotip telah dapat membantu proses pengesanan dan pendiagnosan bagi kes gangguan limfaproliferatif dijalankan dengan lebih cepat dan keputusan dapat dikeluarkan dengan segera (Witzig *et al.*,1990).

Secara ringkasnya, dalam teknik flow sitometri, pengekspresian antigen pada permukaan sel atau intraselular sel-sel tunggal dikesan dengan melihat kepada jumlah sinaran pendaflour yang dipancarkan oleh sel-sel tunggal yang telah dilabelkan dengan antibodi berpendaflour sewaktu sel-sel tersebut disalurkan melalui cahaya laser. Analisis flow sitometri telah dikenal pasti sebagai suatu kaedah yang amat berguna dalam mengenal perbezaan di antara sel-sel normal dan neoplastik di dalam populasi sel hematopoietik dan sel limfoid. Keupayaan flow sitometri untuk mengukur pelbagai parameter seperti peratus pengekspresian sesuatu penanda antigen pada permukaan sel, pengekspresian antigen intraselular dan juga indeks DNA (asid deoksiribonukleik) pada setiap satu sel dalam masa yang singkat menyebabkan ianya bukan sahaja sesuai digunakan dalam bidang kajian imunologi, hematologi dan karsinogenesis tetapi juga telah diperluaskan

penggunaannya dalam bidang klinikal seperti ujian diagnostik dan kaedah kawalan bagi pesakit yang mengalami malignansi hematolimfoid (Yang dan Andreef, 1994).

Penggunaan kaedah flow sitometri dalam ujian imunofenotip menggunakan antibodi monoklon yang spesifik terhadap antigen permukaan sel dan komponen intraselular telah meningkatkan pemahaman dan pengetahuan berkenaan dengan origin dan tahap pembezaan sel dalam penyakit leukemia akut dan kronik di samping penyakit malignan NHL. Walaupun sel-sel blas yang belum matang dan sel-sel limfoma kelihatan sama dari segi morfologi; tetapi dengan adanya teknik imunofenotip menggunakan kaedah flow sitometri, telah dapat ditunjukkan bahawa sel-sel tersebut terdiri dari lineaj sel yang berlainan serta peringkat pembezaan yang berbeza. Ini telah menunjukkan bahawa analisis flow sitometri telah dapat membantu dalam memberikan pendiagnosan yang tepat dan jitu apabila disertakan bersama dapatan klinikal, analisis morfologi dan sitokimia (Rothe *et al.*, 1996).

Perbezaan diagnosis di antara limfoma dan lesi metastatik dapat dilihat pada pengekspresian antigen pada permukaan sel (Weinberg *et al.*, 1984) yang mana pengekspresian antigen pada permukaan sel-sel limfoma mempunyai perubahan secara kuantitatif atau taburan secara abnormal yang seterusnya dapat menunjukkan ciri-ciri sel neoplastik (Picker *et al.*, 1987). Selain daripada nilai nisbah kappa: lambda ($\kappa:\lambda$) yang abnormal; iaitu menunjukkan secara predominan pengekspresian salah satu imunoglobulin (Ig) rantai ringan pada permukaan sel limfosit B, ciri-ciri lain yang menunjukkan keadaan neoplastik dalam kes NHL adalah seperti pengekspresian secara abnormal atau pengurangan pengekspresian penanda permukaan pada sel limfoid lineaj sel B atau T (Braylan *et al.*, 1993). Pendiagnosan NHL melalui analisis kitar sel dan DNA

ploidi juga boleh dikesan menggunakan kaedah flow sitometri memandangkan kaedah ini dapat menunjukkan suatu korelasi yang baik di antara gred, survival dan fasa-S dalam kes NHL (Duque, 1993).

Braylan *et al.* (1989) dan Morse *et al.* (1994) mendapati analisis flow sitometri boleh digunakan dalam menentukan ciri-ciri penyakit limfoma dan mendiagnoskan NHL. Kaedah ini dapat diaplikasikan secara meluas terutamanya dalam pengelasan gangguan hematolimfoid kerana ianya berupaya untuk menjalankan analisis penentuan lineaj bagi sel-sel limfoid yang terlibat dalam gangguan limfaproliferatif, melakukan analisis pencirian tahap kematangan sel-sel malignan, pengesanan klon terutamanya dalam kes NHL dan juga melakukan analisis kuantitatif bagi sel-sel hematopoietik (Rothe *et al.*,1996).

Di dalam tisu-tisu normal, terdapat campuran sel limfosit B yang membawa rantai ringan Ig kappa dan lambda pada nisbah lebih kurang 1.5:1. Oleh yang demikian, nisbah kappa:lambda yang lebih dari 3:1 atau kurang dari 0.25 adalah dikatakan abnormal dan menjadi salah satu petunjuk kepada keadaan monoklon bagi sel-sel limfosit NHL (Duque, 1993; Braylan, 1993). Diagnosis terhadap NHL boleh dilakukan terutamanya apabila majoriti sel-sel yang dianalisa terdiri daripada sel limfosit B yang mempunyai nisbah kappa:lambda lebih besar daripada 3.0 atau kurang daripada 0.25 (>3.0 atau <0.25), manakala keadaan malignansi bukan hematologi boleh dijangka sekiranya sel-sel menunjukkan pengekspresian CD45 (*leukocyte common antigen*, LCA) kurang daripada 75% (Morse *et al.*, 1994).